



## Хроническая Болезнь Почек Приводит К Нарушению Уплотнительных Соединений Эпителия Желудка И Тонкого Кишечника

1. Абдулхакимов Шерзод Алишер  
угли

Received 2<sup>nd</sup> Aug 2023,  
Accepted 19<sup>th</sup> Aug 2023,  
Online 9<sup>th</sup> Sep 2023

<sup>1</sup> Бухарский государственный  
медицинский институт имени  
Абу Али ибн Сины, Узбекистан, г.  
Бухара, ул. А. Навои. 1

**Резюме:** Сохранность тугоплотных соединений (ТПС), которые запечатывают промежутки между эпителиальными клетками пищеварительного тракта, имеет важное значение для предотвращения проникновения микробных токсинов, антигенов и других вредных продуктов в подэпителиальные ткани и внутреннюю среду организма. Нарушение эпителиального барьера кишечника, которое позволяет поглощать эти продукты, приводит к локальному и системному воспалению. Мы недавно обнаружили уменьшение ключевых белковых компонентов тугоплотных соединений эпителия толстого кишечника у животных с хронической болезнью почек (ХБП). Посмертные исследования показали наличие воспаления во всем пищеварительном тракте у уремических людей. Это наблюдение подразумевает, что уремия может вызвать нарушение эпителиального барьера во всех отделах пищеварительного тракта, включая желудок, тощую кишку и подвздошную кишку. Настоящее исследование было предпринято с целью исследования этой возможности.

**Ключевые слова:** Гастрит • Энтероколит • Воспаление • Недоедание • Терминальная стадия хронической почечной недостаточности • Уремия.

### Актуальность.

Сохранность уплотнительных соединений эпителия желудочно-кишечного тракта (УС), которые запечатывают промежутки между эпителиальными клетками, имеет важное значение для предотвращения проникновения микробных токсинов, антигенов и других вредных веществ из прослойки слизистой ткани и, в конечном итоге, во внутреннюю среду организма. Позволяя проникновение этих продуктов во внутреннюю среду, нарушение структуры и функции эпителиального барьера кишечника приводит к локальному и системному воспалению. Хроническая болезнь почек (ХБП) ассоциируется с системным воспалением,

которое играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, анемии, недоедания и различных других осложнений. Существует все больше доказательств наличия дисфункции барьера желудочно-кишечного тракта и его роли в патогенезе системного воспаления у уремических людей и животных. Например, у уремических людей и животных увеличена проницаемость кишечника для полиэтиленгликолей большой молекулярной массы, уретральные бактерии проникают в стенку кишечника и оседают в брыжейках лимфатических узлов у уремических крыс, пациенты на гемодиализе часто проявляют гистологические признаки хронического воспаления вдоль всего желудочно-кишечного тракта, и эндотоксемия неизменно присутствует у пациентов на диализе в отсутствие клинической инфекции. Эти наблюдения указывают на увеличение проницаемости кишечника и нарушение барьерной функции у пациентов и животных с продвинутой ХБП.

Однако до недавнего времени не был известен механизм, по которому уремия повышает проницаемость эпителия кишечника. В недавнем исследовании мы обнаружили значительное уменьшение ключевых белковых компонентов эпителиальных УС толстого кишечника у крыс с ХБП. Убыль структуры эпителиальных УС, выявленная в этом исследовании, раскрыла источник эндотоксемии, которая обычно присутствует и является основной причиной воспаления при ХБП. В последующих *in vitro* исследованиях мы определили мочевины и продукты ее гидролиза микробной уреазой, то есть аммиак и аммоний гидроксид, как основного посредника нарушения барьерной функции и структуры кишечника, обусловленного уремией.

Как указано выше, исследования у уремических людей показали наличие признаков местного воспаления не только в толстой кишке, но и по всему желудочно-кишечному тракту. Это подразумевает, что нарушение структуры и функции эпителиального барьера должно происходить также и в других отделах желудочно-кишечного тракта.

**Цель исследования** - с целью изучения влияния ХБП на аппарат эпителиальных УС в желудке, тонкой кишке и подвздошной кишке.

## **Материалы и методы.**

### *Животные*

Крысы были случайным образом разделены на группы контроля и с хронической болезнью почек (ХБП). Крысы из группы ХБП прошли 5/6 нефрэктомию с использованием дорсальных разрезов, как описано ранее [8]. Группе контроля была выполнена поддельная операция. Животные содержались в помещении с контролируемой температурой, с циклами света/темноты длительностью 12 часов и наблюдались в течение 10 недель. Артериальное давление определялось с использованием плетизмографии хвостовых манжет, как описано ранее [14]. По истечении периода наблюдения животных помещали в метаболические клетки для сбора мочи в течение 24 часов. Затем их анестезировали (кетамин/ксилазин ПК) и усыпляли методом экссангвиниции через сердечное проколорирование. Желудок, тощая кишка и подвздошная кишка извлекались и обрабатывались для выявления ключевых компонентов белков тугоплотных соединений методом иммуноблоттинга. Все эксперименты были утверждены Институциональным комитетом по использованию и уходу за экспериментальными животными Университета Калифорнии, Ирвайн.

### *Анализ методом иммуноблоттинга*

Ткани гомогенизировались на льду в модифицированном растворе RIPA Lysis Buffer, содержащем 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tergitol NP-40, 0,1% натрия додецилсульфата, 1 mM фенилметилсульфонилфторида и ингибитор протеаз. Концентрация

белка в гомогенатах тканей определялась набором для анализа белков по методу БСА (Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США), и 60 мкг общего белка из каждой пробы фракционировались на градиентном геле Bis-Tris 4-12% при напряжении 120 В в течение 2 часов и переносились на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубировали с антителами к клодину-1 или оклюдину (Invitrogen) кролика и антителами к ZO1 (Invitrogen) кролика, разведенными в отношении 1:250, и антителами к актину (Sigma-Aldrich) мыши, разведенными в отношении 1:10 000, в течение ночи. Для вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хреновой корневищной, использовали разведение 1:5000 (Sigma-Aldrich). Мембрану визуализировали с использованием реактива Super Signal West Pico (Pierce) и разрабатывали автоматически.

#### Анализ данных

Для статистической оценки данных использовался t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  СКО. Значимость считалась на уровне  $p < 0,05$ .

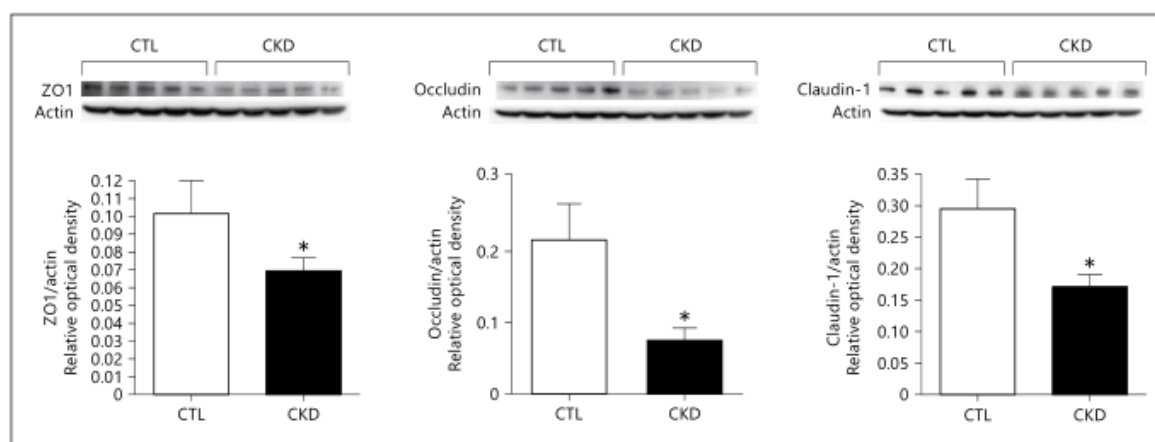
#### Результаты.

##### Общие данные

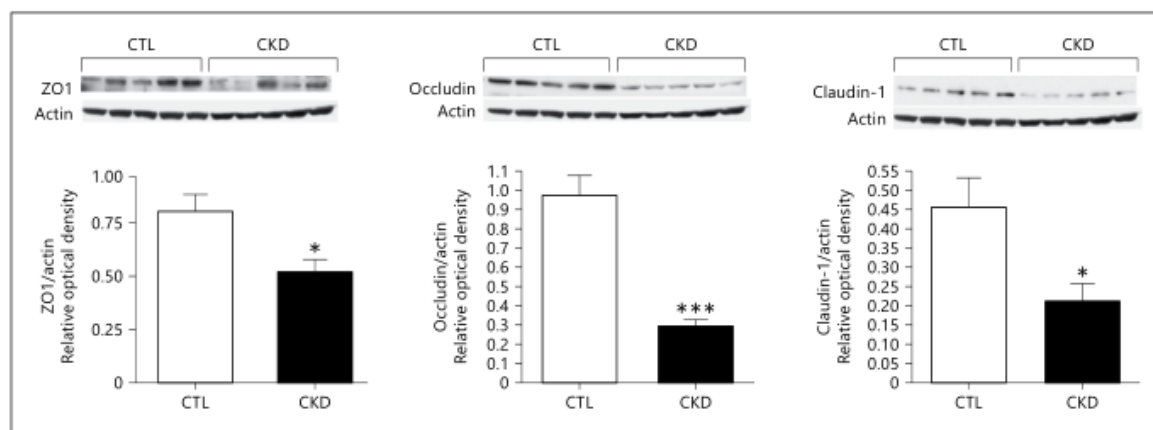
По сравнению с контрольной группой, крысы с ХБП демонстрировали значительное снижение массы тела ( $503 \pm 25$  против  $462 \pm 18$  г,  $p < 0,01$ ) и гематокрита ( $45 \pm 1,2$  против  $37 \pm 1,4\%$ ,  $p < 0,01$ ), а также значительное повышение систолического артериального давления ( $121 \pm 3,4$  против  $155 \pm 2,8$  мм рт. ст.,  $p < 0,01$ ), выделения белка в мочу ( $10,2 \pm 2,5$  против  $143,5 \pm 9,7$  мг/24 ч,  $p < 0,01$ ), концентрации креатинина в плазме ( $0,4 \pm 0,1$  против  $1,4 \pm 0,2$  мг/дл,  $p < 0,01$ ) и концентрации мочевины ( $45 \pm 5,1$  против  $98 \pm 6,4$  мг/дл,  $p < 0,01$ ). Это сопровождалось ярко выраженным повышением уровня малонового альдегида в плазме ( $0,8 \pm 0,1$  против  $1,5 \pm 0,2$  мкмоль/мл), что свидетельствует о наличии системного окислительного стресса.

##### Данные по белкам туглопных соединений (ТПС)

Данные представлены на рисунках 1-3. По сравнению с контрольной группой, в необработанной группе с ХБП наблюдалось яркое снижение содержания белков ключевых трансцеллярных белков ТПС, клодина-1 и оклюдина, в тканях желудка. Снижение содержания клодина-1 и оклюдина в тканях желудка у крыс с ХБП сопровождалось явным снижением основного цитозольного белка ТПС, ZO1. Также содержание клодина-1, оклюдина и ZO1 в тощей кишке и подвздошной кишке значительно уменьшилось у животных с ХБП по сравнению с соответствующими значениями в контрольной группе.



**Рис. 1.** Репрезентативный иммуноблот и групповые данные, отображающие содержание белков ZO1, клодина-1 и оклюдина в желудке нормальных контрольных (CTL) крыс и крыс с ХБП. \*  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Репрезентативный иммуноблот и групповые данные, отображающие содержание белков ZO1, клодина-1 и оклюдина в тощей кишке нормальных контрольных (CTL) крыс и крыс с ХБП. \*  $p < 0,02$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### Обсуждение.

Основным результатом данного исследования является демонстрация значительного снижения ключевых белковых компонентов эпителиальных тугоплотных соединений в желудке, тощей кишке и подвздошной кишке животных с ХБП по сравнению с теми, которые были найдены в группе нормального контроля. Эти результаты расширяют результаты наших предыдущих исследований, которые показали нарушение эпителиальных тугоплотных соединений в толстой кишке при двух различных моделях ХБП, вызванных либо частичной нефрэктомией, либо потреблением пищи, содержащей аденин, что приводит к интенсивному хроническому интерстициальному нефропатии [12].

Аппарат тугоплотных соединений включает в себя трансмембранные, цитозольные и периюнкциональные белки. Трансмембранные белки включают в себя семейства белков окклюдинов и клодинов, которые образуют барьер против проникновения жидкости, растворителей и частиц, соединяя плазматические мембраны соседних клеток. Цитозольные белки, такие как семейство белков зонала окклюденс (ZO), образуют якорь, который одновременно связывает внутриклеточные домены оклюдина и клодина, а также периюнкциональное актиново-миозиновое кольцо [15, 16]. Сохранность тугоплотных соединений имеет важное значение для сохранения функции эпителиального барьера. Следовательно, убыль ключевых белков тугоплотных соединений в толстой кишке, показанная в наших предыдущих исследованиях [12], а также в желудке, тощей и подвздошной кишках, обнаруженная в данном исследовании, способствует связанному с этим локальному и системному воспалению.

Используя культивируемые человеческие колоноциты, нами недавно было обнаружено значительное снижение трансэпителиального электрического сопротивления и убыль белков тугоплотных соединений после инкубации в культуральных средах, содержащих плазму преэмоциональных пациентов с продвинутой ХБП [17]. Воздействие уремии плазмы на эпителиальный барьер было значительно менее интенсивным, когда клетки были подвергнуты плазме после гемодиализа тех же пациентов. В отличие от этого, плазма от здоровых контрольных лиц не оказывала существенного влияния на трансэпителиальное электрическое сопротивление или содержание белков тугоплотных соединений. Эти наблюдения указывают на роль диализуемого уремии ретенционного продукта в нарушении структуры и функции эпителиального барьера кишечника. В последующем исследовании мы определили

мочевину и продукты ее гидролиза микробной уреазой, такие как аммиак и аммоний гидроксид, как основную причину нарушения эпителиальных белков тугоплотных соединений в толстой кишке [13]. Накопление мочевины в жидкостях организма у людей и животных с почечной недостаточностью приводит к ее интенсивному поступлению в желудочно-кишечный тракт через диффузию и включение в секреты желез. В кишечной просвете мочевины гидролизуются микробной уреазой, образуя большие объемы аммиака  $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3]$ , который быстро превращается в аммоний гидроксид  $[\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{OH}]$  [19, 20]. Аммоний гидроксид, в свою очередь, может взаимодействовать и разъединять белки тугоплотных соединений, которые напрямую сталкиваются с просветом и подвергаются воздействию содержимого кишечника. Уремическая диффузия мочевины равномерно происходит на всей протяженности желудочно-кишечного тракта через включение в секреты желез, включая слюну, желудочные соки, желчь, поджелудочные секреты и продукты слизистых желез. Интенсивное поступление мочевины в желудочно-кишечный тракт усугубляется микробной колонизацией верхних отделов кишечника и кардинальной изменчивостью в составе микробиома кишечника у уремиических людей и животных [21]. Поэтому неудивительно, что уремия приводит к нарушению эпителиальных белков тугоплотных соединений и функции барьера на всей протяженности желудочно-кишечного тракта. Учитывая роль мочевины и производных аммиака в патогенезе нарушения структуры кишечного барьера при ХБП, в последнем исследовании мы изучили влияние перорального активированного угля [22] на эпителиальные белки тугоплотных соединений в толстой кишке у уремиических животных. Исследование показало значительное улучшение состояния эпителиальных белков тугоплотных соединений у крыс с ХБП, которым давали пероральный адсорбент. Это сопровождалось значительным ослаблением системного окислительного стресса, воспаления и эндотоксемии.

В заключение, данное исследование демонстрирует значительное нарушение эпителиальных белков тугоплотных соединений в желудке, тощей кишке и подвздошной кишке при уремии. Эти результаты расширяют результаты наших предыдущих исследований, которые показали истощение эпителиальных белков тугоплотных соединений в моделях животных с ХБП и в культивированных человеческих колоноцитах *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Barka T, Anderson PJ (2002) - "Detection of acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as a coupler" - Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Volume 10, pages 741-753.
2. Bergström J, Bittar EE (2009) - "Understanding uremic toxicity mechanisms" - In: The biological basis of medicine, edited by Bittar EE and Bittar N, Academic Press, London, New York, pages 495-544.
3. Birnbaum D, Laufer A, Freund M (2011) - "Investigation of pseudomembranous enterocolitis: A clinicopathological study" - Gastroenterology, Volume 41, pages 345-352.
4. Bollman JL, Mann FC (1997) - "Alterations in blood nitrogen constituents following transplantation of ureters at different levels of the intestine" - Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Volume 24, page 923.
5. Carter D, Einheber A, Bauer H, Rosen H, Burns WF (2006) - "Exploring the role of microbial flora in uremia: Part II - Uremic colitis, cardiovascular lesions, and biochemical observations" - Journal of Experimental Medicine, Volume 123, pages 251-266.



6. Castrup HJ, Löhrs U, Eder M (2010) - "Investigating the development of so-called uremic enterocolitis using autoradiography and histochemistry" - Virchows Archiv [Pathology and Anatomy], Volume 349, pages 357-367.
7. Chanutin A, Ferris EB (2012) - "Inducing experimental renal insufficiency through partial nephrectomy" - Archives of Internal Medicine, Volume 49, pages 767-787.
8. McDermott FT, Nayman WG, deBoer RM (2011) - "Effects of acute renal failure on cell division in the jejunum: Radiographic and ultrastructural studies in mice" - Annals of Surgery, Volume 174, pages 274-282
9. McDermott FT, Galbraith AJ, Dalton AK (2004) - "Investigating the impact of acute renal failure on cell turnover in the ileal epithelium: Autoradiographic studies in mice" - Gastroenterology, Volume 66, pages 235-239.
10. Dobbstein H (2001) - "Understanding the pathogenesis of uremia" - Internist, Volume 12, pages 76-84.

